

**Melanocyte culture medium, useful for growing melanocytes for transplantation in treatment of pigmentation disorders, comprises basal medium with specific supplements**

**Publication number:** DE10162960

**Publication date:** -2003-07-10

**Inventor:** WOLFF ARMIN (DE)

**Applicant:** BIOTISSUE TECHNOLOGIES AG (DE)

**Classification:**

**- international:** C12N5/06; C12N5/08; C12N5/06; C12N5/08; (IPC1-7): C12N5/08

**- european:** C12N5/06B12C

**Application number:** DE20011062960 20011220

**Priority number(s):** DE20011062960 20011220

**Report a data error here**

**Abstract of DE10162960**

A melanocyte culture medium (A), comprising: (a) basal medium for culture of primary human cells, containing not less than 0.6 mM calcium ions and supplemented with transferrin, albumin and glutamine; (b) 0.5-10 mM cyclic adenosine triphosphate (cAMP); (c) 0.5-50 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF); (d) 0.1-100 nM alpha-melanocyte stimulating hormone (aMSH); and (e) 0.1-100 nM endothelin-1 (E1), is new. An Independent claim is also included for a suspension of melanocytes in (A).

---

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide



⑮ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 101 62 960 A 1**

⑤① Int. Cl. 7:  
**C 12 N 5/08**

⑲ Aktenzeichen: 101 62 960.5  
⑳ Anmeldetag: 20. 12. 2001  
㉔ Offenlegungstag: 10. 7. 2003

DE 101 62 960 A 1

⑦① Anmelder:  
BioTissue Technologies AG, 79108 Freiburg, DE

⑦④ Vertreter:  
Schwabe, Sandmair, Marx, 81677 München

⑦② Erfinder:  
Wolff, Armin, Dr., 79108 Freiburg, DE

⑤⑥ Entgegenhaltungen:  
JP 09-2 52 768 A  
JP 08-1 49 975 A  
J.Investigative Dermatology (April 2000) Vol.114,  
No.4, S.859;

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Melanozyten-Kulturmedium und Verwendung desselben

⑤⑦ Die genannten Aufgaben werden erfindungsgemäß gelöst durch ein Melanozyten-Kulturmedium, enthaltend ein für die Kultur von primären human Zellen geeignetes Basismedium, das einen Gehalt an  $\text{Ca}^{2+}$  von nicht unter 0,6 mM aufweist und mit Transferrin, Albumin und Glutamin supplementiert ist, wobei das Melanozyten-Kulturmedium zusätzlich enthält: 0,05 bis 10,0 mM cAMP, 0,5 bis 50 ng/ml bFGF, 0,1 bis 100 nM  $\alpha$ -MSH und 0,1 bis 100 nM Endothelin-1 sowie wahlweise 0,1 bis 50 ng/ml EGF und/oder 0,1 bis 50  $\mu\text{g/ml}$  Insulin.  
In einem zweiten Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung eines wie oben definierten Melanozyten-Kulturmediums zur Züchtung von Melanozyten.

DE 101 62 960 A 1

## Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein für Melanozyten geeignetes und vorzugsweise für Melanozyten selektives Kulturmedium.

## Hintergrund der Erfindung

[0002] Die Melanozyten sind Zellen, die für die Pigmentierung der Haut verantwortlich sind. Sie sind die Orte der Pigmentbildung und Lagerung. Störungen der Pigmentbildung und/oder Lagerung führen entweder zu einer Überpigmentierung beispielsweise in Form von Pigmentflecken, dem Cloasma, Muttermalen, Leberflecken und anderem, oder der Unterpigmentierung, was z. B. im Falle der Vitiligo oder den sogenannten "Altersflecken" zu einem gänzlichen Fehlen von Pigmenten und daher weißen Flecken auf der Haut führen kann. Beide Arten Pigmentierungsstörungen können kosmetisch unerwünscht sein.

[0003] Zur Behandlung von Altersflecken wurde in der Vergangenheit versucht, die umgebende Haut im Farbton an die Flecken anzupassen, also die Haut zu bleichen. Ebenso ist versucht worden, Überpigmentierungen durch Bleichen der betroffenen Hautpartien zu beseitigen. Das Bleichen ist zum einen ein für die gesunde Haut fragwürdiges, da potentiell schädigendes Verfahren. Zum anderen wird das gewünschte Ergebnis oft nicht in zufriedenstellendem Umfang erzielt.

[0004] In jüngerer Zeit mit der Entwicklung der modernen Biotechnologie ist man in schwerwiegenden Fällen der Vitiligo dazu übergegangen, die von der Störung befallenen Hautpartien abzutragen und durch gesunde, d. h. ausreichend pigmentierte Transplantate, vorzugsweise Eigentransplantate zu ersetzen. Hierzu werden dem Spender, bei Eigentransplantaten also dem Patienten, an einer normal pigmentierten Stelle Hauteile entnommen. Aus diesem Biopsat werden selektiv die Melanozyten gezüchtet und vermehrt. Stehen ausreichend Zellen zur Verfügung, werden an der betroffenen Stelle die oberen Hautschichten entfernt und eine die kultivierten Zellen enthaltende Lösung aufgetragen. Die gesunden Melanozyten wachsen an und können nach der Abheilung eine ausreichend pigmentierte Hautpartie bilden. Dies hat die kosmetisch gewünschte Wirkung, dass eine normale Pigmentierung erzielt und gleichzeitig das umgebende Gewebe weitgehend geschont werden kann.

[0005] Da Melanozyten nur einen untergeordneten Prozentsatz der vorhandenen Hautzellen darstellen, wird jedes Spenderbiopsat, aus dem die Melanozyten gezüchtet werden sollen, überwiegend andere Zelltypen, vor allem Fibroblasten und Keratinozyten, enthalten. Jedes für die Züchtung der Melanozyten verwendete Kulturmedium muss daher folgendes leisten: Ersten muss es auf die Melanozyten proliferationsfördernd wirken. Zweitens muss es die Differenzierung des gewünschten Zelltyps fördern oder zumindest stabilisieren. Da Proliferation und terminale Differenzierung oft entgegengesetzte und einander ausschließende Entwicklungsrichtungen sind, die eine Zelle einschlagen kann, sind Kompromißlösungen zwischen beiden für Kulturmedien oft schwer zu finden.

[0006] Drittens sollte ein geeignetes Kulturmedium das Wachstum unerwünschter Zellen, die die Kultur verunreinigen wie beispielsweise Fibroblasten hemmen. Da gerade Fibroblasten die Mehrheit der Hautzellen darstellen und daher zu Melanozyten stets im Überschuß vorhanden sind und andererseits nur sehr geringe Anforderungen an ein Kulturmedium stellen, ist diese Anforderung schwer zu erfüllen und bedarf einer spezifischen Wachstumshemmung dieses Zelltyps.

[0007] Schließlich muss ein Kulturmedium von für die Transplantation bestimmten Zellen mit dieser Endbestimmung kompatibel sein. Das bedeutet, dass das Medium ausschließlich nach dem Arzneimittelgesetz zulässige und verträgliche sowie unter der "good medical practice" tolerierbare Bestandteile enthalten sollte und vorzugsweise enthält.

[0008] Für wissenschaftliche Melanozytenkulturen verwendete Medien erreichen die oben unter erstens bis drittens genannten Ziele üblicherweise durch Zusatz von Phorbolestern wie 12-ortho-Tetradecanoylphorbolacetat (TPA) oder Phorbolmyristinacetat. Alle Phorbolester sind Karzinogene, die unter anderem die Entstehung von Hautkrebs fördern. Eine Retransplantation von potentiell mit Karzinogenen behandelten Zellen verbietet sich jedoch von alleine. Andere, üblicherweise verwendete Bestandteile sind das mitogene Choleratoxin oder fötales Kälberserum (FCS), das ein starkes Antigen darstellt und aus diesem Grunde nicht geeignet ist.

[0009] Kommerziell für medizinische Zwecke werden derzeit zwei Medien der Firma Promocell GmbH (Heidelberg, Deutschland) verwendet, von denen eines den oben genannten Phorbolester TPA sowie einen Rinderhypoophysenextrakt enthält (Handelsname: Melanocyte Growth Medium, Kat.-Nr. C-24010). Das TPA-freie Medium der Firma Promocell (Handelsname: Melanocyte Growth Medium M2, Kat.-Nr. C-24300) weist demgegenüber den Nachteil einer zu geringen Vermehrungsrate der Melanozyten auf.

[0010] Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Melanozyten-Kulturmedium bereitzustellen, welches die oben genannten Kriterien erfüllt. Es ist weiterhin Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Melanozyten-Kulturmedium bereitzustellen, das den Anforderungen des AMG wie auch der GMP-Richtlinie genügt.

## Zusammenfassung der Erfindung

[0011] Die genannten Aufgaben werden erfindungsgemäß gelöst durch ein Melanozyten-Kulturmedium, enthaltend ein für die Kultur von primären human Zellen geeignetes Basismedium, das einen Gehalt an  $\text{Ca}^{2+}$  von nicht unter 0,6 mM aufweist und mit Transferrin, Albumin und Glutamin supplementiert ist, wobei das Melanozyten-Kulturmedium zusätzlich enthält: 0,05 bis 10,0 mM cAMP, 0,5 bis 50 ng/ml bFGF, 0,1 bis 100 nM  $\alpha$ -MSH und 0,1 bis 100 nM Endothelin-1 sowie wahlweise 0,1 bis 50 ng/ml EGF und/oder 0,1 bis 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Insulin.

[0012] In einem zweiten Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung eines wie oben definierten Melanozyten-Kulturmediums zur Züchtung von Melanozyten.

## Genaue Beschreibung der Erfindung

[0013] Wie oben beschrieben, betrifft die Erfindung ein spezielles Melanozyten-Kulturmedium. Dieses Melanozyten-Kulturmedium ist frei von jeglichen Karzinogenen. Darüber hinaus enthält es vorzugsweise ausschließlich nach dem AMG sowie nach den GMP-Richtlinien der EU zur Verwendung am Menschen zugelassene Substanzen. Die aus der Kultur gewonnenen Melanozyten können damit ohne Bedenken hinsichtlich des Kulturmediums als Transplantat verwendet werden.

[0014] Das erfindungsgemäße Melanozyten-Kulturmedium enthält ein für die Kultur von primären human Zellen geeignetes, vorzugsweise reichhaltiges Basismedium, das einen Gehalt an  $\text{Ca}^{2+}$  von nicht unter 0,6 mM, vorzugsweise nicht unter 0,8 mM, aufweist und mit Transferrin, Albumin und Glutamin supplementiert ist. Das Melanozyten-Kulturmedium enthält zusätzlich: 0,05 bis 10,0 mM cAMP, sowie

die Kombination aus 0,5 bis 50 ng/ml bFGF, 0,1 bis 100 nM  $\alpha$ -MSH und 0,1 bis 100 nM Endothelin-1. Vorzugsweise enthält das Melanozyten-Kulturmedium 0,1 bis 1,0 mM cAMP, 1,0 bis 15,0 ng/ml bFGF, 5,0 bis 50 nM  $\alpha$ -MSH und 5,0 bis 50 nM Endothelin-1 und noch stärker bevorzugt 0,4–0,6 mM cAMP, 2,5 bis 7,5 ng/ml bFGF, 5,0 bis 15,0 nM  $\alpha$ -MSH und 5,0 bis 15,0 nM Endothelin-1.

[0015] Erfindungsgemäß kann grundsätzlich jedes bekannte und für die Kultivierung von primären human Zellen geeignete Basismedium verwendet werden. Bevorzugt handelt es sich um ein relativ reichhaltiges Medium (kein Mangelmedium). Das Basismedium kann jede geeignete Kohlenstoff- und/oder Stickstoffquelle verwendet werden. Vorzugsweise werden Kohlenstoff und Stickstoffquellen verwendet, die den Vorgaben des AMG und der GMP-Richtlinie entsprechen. Das Medium weist in jedem Fall eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt von nicht unter 0,6 mM, vorzugsweise nicht unter 0,8 mM auf. Weiterhin ist das Medium mit geeigneten Mengen an Transferrin, Albumin und Glutamin supplementiert. Die Konzentrationen sind hier variabel und können vom Fachmann anhand von Routineversuchen bestimmt und optimiert werden.

[0016] Ein geeignetes und für die Zwecke der vorliegenden Erfindung bevorzugtes Medium ist das PC-1 Basalmmedium, das von der Firma Bio Whittaker, Verviers, BE (Kat.-Nr. 77232) ergänzt durch das entsprechende Supplement Bio Whittaker, Verviers, BE (Kat.-Nr. 344022).

[0017] Der erste erfindungswesentliche Zusatz des erfindungsgemäßen Melanozyten-Kulturmediums ist cAMP (cyclisches Adenosin-Monophosphat). Das cAMP wirkt als Proliferations- und Differenzierungsfaktor für Melanozyten. Gleichzeitig hemmt es das Wachstum von Fibroblasten, die für Melanozyten-Kulturen üblicherweise die problematische Verunreinigungen darstellen. Die cAMP-Konzentration liegt im allgemeinen zwischen 0,05 und 10,0 mM, vorzugsweise 0,1 bis 1,0 mM und am meisten bevorzugt 0,4 bis 0,6 mM, wobei eine Konzentration von 0,5 mM das Optimum für das Wachstum der Melanozyten zu sein scheint.

[0018] Der zweite erfindungswesentliche Zusatz zum Melanozyten-Kulturmedium ist die Kombination aus bFGF (basic Fibroblast-like Growth Factor),  $\alpha$ -MSH ( $\alpha$ -Melanotropin oder auch Melanozyten stimulierendes Hormon (MSH) genannt) und Endothelin-1. Die Kombination aller drei Zusätze hemmt synergistisch das Fibroblastenwachstum und fördert, vermutlich ebenfalls in synergistischer Weise, das Melanozytenwachstum. Alle drei Proteine sind an sich bekannt und werden vorzugsweise in der humanen Form verwendet.

[0019] Der bFGF ist erfindungsgemäß ein einer Konzentration von 0,5 bis 50 ng/ml, vorzugsweise 1,0 bis 15,0 ng/ml und am meisten bevorzugt 2,5 bis 7,5 ng/ml enthalten. Mit steigender Konzentration steigt auch die Zellausbeute an Melanozyten bis zu einem Sättigungswert an. Die Minimalmengen erscheinen insbesondere für die Kultivierung von Melanozyten aus Vitiligo-Patienten kritisch und sollten daher vorzugsweise nicht unterschritten werden.

[0020] Das  $\alpha$ -MSH ist erfindungsgemäß ein einer Konzentration von 0,1 bis 100 nM, vorzugsweise 5,0 bis 50,0 nM und am meisten bevorzugt 5,0 bis 15,0 nM enthalten. Die Konzentrationen an Endothelin-1 betragen erfindungsgemäß von 0,1 bis 100 nM, vorzugsweise 5,0 bis 50,0 nM und am meisten bevorzugt 5,0 bis 15,0 nM. Die angegebenen Konzentrationen sind jedoch insbesondere hinsichtlich der Obergrenzen nicht kritisch, jedoch aus Kostengründen zu bevorzugen.

[0021] Das erfindungsgemäße Melanozyten-Kulturmedium kann zusätzlich 0,1 bis 50 ng/ml EFG (Epidermal Growth Factor) und/oder 0,1 bis 50  $\mu$ g/ml Insulin enthalten.

Bei beiden Proteinen handelt es sich um generelle Wachstumsfaktoren für Hautzellen, die vorzugsweise in der humanen Form verwendet werden. Da EGF auch das Wachstum von Fibroblasten fördert, ist seine Konzentration möglichst im unteren angegebenen Bereich anzusiedeln, obwohl auch höhere Konzentrationen verwendet werden können. Dies kann allerdings zum Verlust der Selektivität für Melanozyten führen. Bei dem hier genannten, vorzugsweise enthält das Melanozyten-Kulturmedium 0,1 bis 50 ng/ml EFG und 0,1 bis 50  $\mu$ g/ml Insulin, noch stärker bevorzugt 1 bis 10 ng/ml EFG und 1 bis 10  $\mu$ g/ml Insulin.

[0022] In einem zweiten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung des oben beschriebenen Melanozyten-Kulturmediums zur Züchtung von Melanozyten, insbesondere zur selektiven Züchtung. Die Kulturbedingungen sind dem Fachmann bekannt und können anhand von Routineexperimenten optimiert werden.

[0023] Die Züchtung der Melanozyten unter Verwendung des erfindungsgemäßen Mediums erfolgt ausgehend von Gewebebiopsien eines Spenders und vorzugsweise des zu behandelnden Patienten selbst. Vorzugsweise sind die erhaltenen Melanozyten zur Reimplantation in den Menschen, insbesondere den Spender bestimmt. Sind Spender und Empfänger identisch, ist eine Transplantatabstoßung nicht zu befürchten, sofern nicht das Kulturmedium antigene Substanzen enthält. Letzteres entspricht nicht dem AMG und ist daher nicht erwünscht.

[0024] Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Mediums ist die selektive Inhibition des Fibroblastenwachstums bei gleichzeitig hohen Vermehrungsraten der Melanozyten. In entsprechenden Vergleichsversuchen mit den kommerziell von der Firma Promocell vertriebenen Melanozyten-Kulturmedien (TPA-Medium und TPA-freies Medium) hat die Anmelderin gefunden, dass das erfindungsgemäße Melanozyten-Kulturmedium den mit diesen genannten Medien erzielten Ergebnissen mindestens vergleichbare Ergebnisse liefert, wenn nicht bessere.

#### Beispiele

[0025] Für Vergleichsversuche mit den oben genannten Medien der Firma Promocell wurde folgendes Medium hergestellt und eingesetzt.

#### Tabelle 1

##### Verwendetes Medium

[0026] PC-1 Basalmmedium (Bio Whittaker, Verviers, BE; Kat.-Nr. 77232) Supplement: (Bio Whittaker, Verviers, BE; Kat.-Nr. 344022)

+0,5 mM cAMP

+5 ng/ml bFGF

+10 nM  $\alpha$ -MSH

+10 nM Endothelin-1

+5 ng/ml EGF

+5  $\mu$ g/ml Insulin (entspricht 0,125 I. E./ml)

[0027] Zum direkten Vergleich wurden parallele Zellkulturen aus Biopsaten derselben Testpersonen mit den genannten Medien etabliert und nach gängigen Verfahren geführt. Im Ergebnis entspricht das Wachstum und die Morphologie von etablierten Melanozyten-Kulturen mit dem erfindungsgemäßen Medium etwa denjenigen des TPA-Mediums. Allerdings bietet das erfindungsgemäße Medium Vorteile bei der Etablierung der Kultur, dahingehend, dass die Zellausbeute durchschnittlich 5 bis 10-mal höher liegt. Diese höhere Zellausbeute könnte am Wachstum von ebenfalls im Biopsat vorhandenen Keratinozyten liegen, die wiederum

das Wachstum der Melanozyten fördern. Ein Wachstum von Keratinozyten wurde dagegen im TPA-Medium der Fa. Promocell nicht beobachtet.

[0028] Das TPA-freie Medium der Fa. Promocell, das ebenfalls als Vergleich genutzt wurde, weist vergleichbare Nachteile bezüglich der Primärkultur (Zellausbeuten) auf und liefert darüber hinaus wesentlich geringere Vermehrungsraten. So betrug in Vergleichsmessungen die Verdopplungsgeschwindigkeit mit dem TPA-freien Medium ca. 7 Tagen, während sie für das erfindungsgemäße Medium aus Tabelle 13 bis 5 Tage betrug.

[0029] Hinsichtlich Morphologie, Qualität der Zellen, Melaninsynthese oder maximaler Kulturdauer (d. h. Zahl der Passagen) entsprach oder übertraf das erfindungsgemäße Medium das jeweils bessere der beiden Vergleichsmedien in jedem Experiment.

#### Patentansprüche

1. Melanozyten-Kulturmedium, enthaltend ein für die Kultur von primären human Zellen geeignetes Basismedium, das einen Gehalt an  $\text{Ca}^{2+}$  von nicht unter 0,6 mM aufweist und mit Transferrin, Albumin und Glutamin supplementiert ist, welches Melanozyten-Kulturmedium zusätzlich enthält: 0,05–10,0 mM cAMP, 0,5–50 ng/ml bFGF, 0,1–100 nM  $\alpha$ -MSH und 0,1–100 nM Endothelin-1.
2. Melanozyten-Kulturmedium nach Anspruch 1, enthaltend: 0,1–1,0 mM cAMP, 1,0–15 ng/ml bFGF, 5,0–50 nM  $\alpha$ -MSH und 5,0–50 nM Endothelin-1.
3. Melanozyten-Kulturmedium nach Anspruch 1, enthaltend: 0,4–0,6 mM cAMP, 2,5–7,5 ng/ml bFGF, 5,0–15,0 nM  $\alpha$ -MSH und 5,0–15,0 nM Endothelin-1.
4. Melanozyten-Kulturmedium nach einem der vorstehenden Ansprüche, zusätzlich enthaltend 0,1–50 ng/ml EFG und/oder 0,1–50  $\mu\text{g/ml}$  Insulin.
5. Melanozyten-Kulturmedium nach einem der vorstehenden Ansprüche, zusätzlich enthaltend 0,1–50 ng/ml EFG und 0,1–50  $\mu\text{g/ml}$  Insulin.
6. Melanozyten-Kulturmedium nach einem der Ansprüche 1 bis 3, zusätzlich enthaltend 1–10 ng/ml EFG und 1–10  $\mu\text{g/ml}$  Insulin.
7. Verwendung eines Melanozyten-Kulturmedium gemäß einem der vorstehenden Ansprüche zur Züchtung von Melanozyten.
8. Verwendung nach Anspruch 7, worin die Züchtung ausgehend von Gewebebiopsien eines Patienten erfolgt.
9. Verwendung nach Anspruch 7 oder 8, worin die Melanozyten zur Reimplantation in den Menschen bestimmt sind.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 7 bis 10, worin das Wachstum von konkurrierenden Fibroblasten selektiv inhibiert wird.
11. Melanozytensuspension in einem Medium gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6.



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 101 62 960 B4** 2004.03.18

(12)

## Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **101 62 960.5**  
(22) Anmeldetag: **20.12.2001**  
(43) Offenlegungstag: **10.07.2003**  
(45) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: **18.03.2004**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **C12N 5/08**

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden.

(71) Patentinhaber:  
**BioTissue Technologies AG i.Ins., 79108 Freiburg,  
DE**

(72) Erfinder:  
**Wolff, Armin, Dr., 79108 Freiburg, DE**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
gezogene Druckschriften:  
**JP 09-2 52 768 A**  
**JP 08-1 49 975 A**  
**J.Investigative Dermatology (April 2000) Vol.114,  
No.4, S.859;**

(54) Bezeichnung: **Melanozyten-Kulturmedium und Verwendung desselben**

(57) Hauptanspruch: Melanozyten-Kulturmedium, enthaltend ein für die Kultur von primären human Zellen geeignetes Basismedium, das einen Gehalt an  $\text{Ca}^{2+}$  von nicht unter 0,6mMol/l aufweist und mit Transferrin, Albumin und Glutamin supplementiert ist, welches Melanozyten-Kulturmedium zusätzlich enthält: 0,05 – 10,0mMol/l cAMP, 0,5 – 50 ng/ml bFGF, 0,1 – 100mMol/l  $\alpha$ -MSH und 0,1 – 100mMol/l Endothelin-1.

### Beschreibung

[0001] Die Melanozyten sind Zellen, die für die Pigmentierung der Haut verantwortlich sind. Sie sind die Orte der Pigmentbildung und Lagerung. Störungen der Pigmentbildung und/oder Lagerung führen entweder zu einer Überpigmentierung beispielsweise in Form von Pigmentflecken, dem Cloasma, Muttermalen, Leberflecken und anderem, oder der Unterpigmentierung, was z.B. im Falle der Vitiligo oder den sogenannten „Altersflecken“ zu einem gänzlichen Fehlen von Pigmenten und daher weißen Flecken auf der Haut führen kann. Beide Arten Pigmentierungsstörungen können kosmetisch unerwünscht sein.

### Stand der Technik

[0002] Zur Behandlung von Altersflecken wurde in der Vergangenheit versucht, die umgebende Haut im Farbton an die Flecken anzupassen, also die Haut zu bleichen. Ebenso ist versucht worden, Überpigmentierungen durch Bleichen der betroffenen Hautpartien zu beseitigen. Das Bleichen ist zum einen ein für die gesunde Haut fragwürdiges, da potentiell schädigendes Verfahren. Zum anderen wird das gewünschte Ergebnis oft nicht in zufriedenstellendem Umfang erzielt.

[0003] In jüngerer Zeit mit der Entwicklung der modernen Biotechnologie ist man in schwerwiegenden Fällen der Vitiligo dazu übergegangen, die von der Störung befallenen Hautpartien abzutragen und durch gesunde, d.h. ausreichend pigmentierte Transplantate, vorzugsweise Eigentransplantate zu ersetzen. Hierzu werden dem Spender, bei Eigentransplantaten also dem Patienten, an einer normal pigmentierten Stelle Hautteile entnommen. Aus diesem Biopsat werden selektiv die Melanozyten gezüchtet und vermehrt. Stehen ausreichend Zellen zur Verfügung, werden an der betroffenen Stelle die oberen Hautschichten entfernt und eine die kultivierten Zellen enthaltende Lösung aufgetragen. Die gesunden Melanozyten wachsen an und können nach der Abheilung eine ausreichend pigmentierte Hautpartie bilden. Dies hat die kosmetisch gewünschte Wirkung, dass eine normale Pigmentierung erzielt und gleichzeitig das umgebende Gewebe weitgehend geschont werden kann.

[0004] Da Melanozyten nur einen untergeordneten Prozentsatz der vorhandenen Hautzellen darstellen, wird jedes Spenderbiopsat, aus dem die Melanozyten gezüchtet werden sollen, überwiegend andere Zelltypen, vor allem Fibroblasten und Keratinozyten, enthalten. Jedes für die Züchtung der Melanozyten verwendete Kulturmedium muss daher folgendes leisten: Ersten muss es auf die Melanozyten proliferationsfördernd wirken. Zweitens muss es die Differenzierung des gewünschten Zelltyps fördern oder zumindest stabilisieren. Da Proliferation und terminale Differenzierung oft entgegengesetzte und einander ausschließende Entwicklungsrichtungen sind, die

eine Zelle einschlagen kann, sind Kompromißlösungen zwischen beiden für Kulturmedien oft schwer zu finden.

[0005] Drittens sollte ein geeignetes Kulturmedium das Wachstum unerwünschter Zellen, die die Kultur verunreinigen wie beispielsweise Fibroblasten hemmen. Da gerade Fibroblasten die Mehrheit der Hautzellen darstellen und daher zu Melanozyten stets im Überschuß vorhanden sind und andererseits nur sehr geringe Anforderungen an ein Kulturmedium stellen, ist diese Anforderung schwer zu erfüllen und bedarf einer spezifischen Wachstumshemmung dieses Zelltyps.

[0006] Schließlich muss ein Kulturmedium von für die Transplantation bestimmten Zellen mit dieser Endbestimmung kompatibel sein. Das bedeutet, dass das Medium ausschließlich nach dem Arzneimittelgesetz zulässige und verträgliche sowie unter der „good medical practice“ tolerierbare Bestandteile enthalten sollte und vorzugsweise enthält.

[0007] Für wissenschaftliche Melanozytenkulturen verwendete Medien erreichen die oben unter erstens bis drittens genannten Ziele üblicherweise durch Zusatz von Phorbolestern wie 12-ortho-Tetradecanoylphorbolacetat (TPA) oder Phorbolmyristinacetat. Alle Phorbolester sind Karzinogene, die unter anderem die Entstehung von Hautkrebs fördern. Eine Retransplantation von potentiell mit Karzinogenen behandelten Zellen verbietet sich jedoch von alleine. Andere, üblicherweise verwendete Bestandteile sind das mitogene Choleratoxin oder fötales Kälberserum (FCS), das ein starkes Antigen darstellt und aus diesem Grunde nicht geeignet ist.

[0008] Kommerziell für medizinische Zwecke werden derzeit zwei Medien der Firma Promocell GmbH (Heidelberg, Deutschland) verwendet, von denen eines den oben genannten Phorbolester TPA sowie einen Rinderhypophysenextrakt enthält (Handelsname: Melanocyte Growth Medium, Kat.-Nr. C-24010). Das TPA-freie Medium der Firma Promocell (Handelsname: Melanocyte Growth Medium M2, Kat.-Nr. C-24300) weist demgegenüber den Nachteil einer zu geringen Vermehrungsrate der Melanozyten auf.

### Aufgabenstellung

[0009] Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Melanozyten-Kulturmedium bereitzustellen, welches die oben genannten Kriterien erfüllt. Es ist weiterhin Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Melanozyten-Kulturmedium bereitzustellen, das den Anforderungen des AMG wie auch der GMP-Richtlinie genügt.

### Zusammenfassung der Erfindung

[0010] Die genannten Aufgaben werden erfindungsgemäß gelöst durch ein Melanozyten-Kulturmedium, enthaltend ein für die Kultur von primären human Zellen geeignetes Basismedium, das einen Gehalt an

$\text{Ca}^{2+}$  von nicht unter 0,6 mMol/l aufweist und mit Transferrin, Albumin und Glutamin supplementiert ist, wobei das Melanozyten-Kulturmedium zusätzlich enthält: 0,05 bis 10mMol/l cAMP, 0,5 bis 50 ng/ml bFGF, 0,1 bis 10mMol/l  $\alpha$ -MSH und 0,1 bis 100 mMol/l Endothelin-1 sowie wahlweise 0,1 bis 50 ng/ml EGF und/oder 0,1 bis 50  $\mu$ g/ml Insulin.

[0011] In einem zweiten Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung eines wie oben definierten Melanozyten-Kulturmediums zur Züchtung von Melanozyten.

#### Genaue Beschreibung der Erfindung

[0012] Wie oben beschrieben, betrifft die Erfindung ein spezielles Melanozyten-Kulturmedium. Dieses Melanozyten-Kulturmedium ist frei von jeglichen Karzinogenen. Darüber hinaus enthält es vorzugsweise ausschließlich nach dem AMG sowie nach den GMP-Richtlinien der EU zur Verwendung am Menschen zugelassene Substanzen. Die aus der Kultur gewonnenen Melanozyten können damit ohne Bedenken hinsichtlich des Kulturmediums als Transplantat verwendet werden.

[0013] Das erfindungsgemäße Melanozyten-Kulturmedium enthält ein für die Kultur von primären human Zellen geeignetes, vorzugsweise reichhaltiges Basismedium, das einen Gehalt an  $\text{Ca}^{2+}$  von nicht unter 0,6mMol/l, vorzugsweise nicht unter 0,8mMol/l, aufweist und mit Transferrin, Albumin und Glutamin supplementiert ist. Das Melanozyten-Kulturmedium enthält zusätzlich: 0,05 bis 10,0 mM cAMP, sowie die Kombination aus 0,5 bis 50 ng/ml bFGF, 0,1 bis 100mMol/l  $\alpha$ -MSH und 0,1 bis 100mMol/l Endothelin-1. Vorzugsweise enthält das Melanozyten-Kulturmedium 0,1 bis 1,0mMol/l cAMP, 1,0 bis 15,0 ng/ml bFGF, 5,0 bis 50mMol/l  $\alpha$ -MSH und 5,0 bis 50mMol/l Endothelin-1 und noch stärker bevorzugt 0,4 – 0,6mMol/l cAMP, 2,5 bis 7,5 ng/ml bFGF, 5,0 bis 15,0mMol/l  $\alpha$ -MSH und 5,0 bis 15,0mMol/l Endothelin-1.

[0014] Erfindungsgemäß kann grundsätzlich jedes bekannte und für die Kultivierung von primären human Zellen geeignete Basismedium verwendet werden. Bevorzugt handelt es sich um ein relativ reichhaltiges Medium (kein Mangelmedium). Das Basismedium kann jede geeignete Kohlenstoff- und/oder Stickstoffquelle verwendet werden. Vorzugsweise werden Kohlenstoff- und Stickstoffquellen verwendet, die den Vorgaben des AMG und der GMP-Richtlinie entsprechen. Das Medium weist in jedem Fall eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt von nicht unter 0,6mMol/l, vorzugsweise nicht unter 0,8mMol/l auf. Weiterhin ist das Medium mit geeigneten Mengen an Transferrin, Albumin und Glutamin supplementiert. Die Konzentrationen sind hier variabel und können vom Fachmann anhand von Routineversuchen bestimmt und optimiert werden.

[0015] Ein geeignetes und für die Zwecke der vorliegenden Erfindung bevorzugtes Medium ist das PC-1 Basalmedium, das von der Firma Bio Whittaker, Ver-

viers, BE (Kat.-Nr. 77232) ergänzt durch das entsprechende Supplement Bio Whittaker, Verviers, BE (Kat.-Nr. 344022).

[0016] Der erste erfindungswesentliche Zusatz des erfindungsgemäßen Melanozyten-Kulturmediums ist cAMP (cyclisches Adenosin-Monophosphat). Das cAMP wirkt als Proliferations- und Differenzierungsfaktor für Melanozyten. Gleichzeitig hemmt es das Wachstum von Fibroblasten, die für Melanozyten-Kulturen üblicherweise die problematische Verunreinigungen darstellen. Die cAMP-Konzentration liegt im allgemeinen zwischen 0,05 und 10,0mMol/l, vorzugsweise 0,1 bis 1,0mMol/l und am meisten bevorzugt 0,4 bis 0,6mMol/l, wobei eine Konzentration von 0,5mMol/l das Optimum für das Wachstum der Melanozyten zu sein scheint.

[0017] Der zweite erfindungswesentliche Zusatz zum Melanozyten-Kulturmedium ist die Kombination aus bFGF (basic Fibroblast-like Growth Factor),  $\alpha$ -MSH ( $\alpha$ -Melanotropin oder auch Melanozyten stimulierendes Hormon (MSH) genannt) und Endothelin-1. Die Kombination aller drei Zusätze hemmt synergistisch das Fibroblastenwachstum und fördert, vermutlich ebenfalls in synergistischer Weise, das Melanozytenwachstum. Alle drei Proteine sind an sich bekannt und werden vorzugsweise in der humanen Form verwendet.

[0018] Der bFGF ist erfindungsgemäß ein einer Konzentration von 0,5 bis 50 ng/ml, vorzugsweise 1,0 bis 15,0 ng/ml und am meisten bevorzugt 2,5 bis 7,5 ng/ml enthalten. Mit steigender Konzentration steigt auch die Zellausbeute an Melanozyten bis zu einem Sättigungswert an. Die Minimalmengen erscheinen insbesondere für die Kultivierung von Melanozyten aus Vitiligo-Patienten kritisch und sollten daher vorzugsweise nicht unterschritten werden.

[0019] Das  $\alpha$ -MSH erfindungsgemäß ein einer Konzentration von 0,1 bis 100mMol/l, vorzugsweise 5,0 bis 50,0mMol/l und am meisten bevorzugt 5,0 bis 15,0mMol/l enthalten. Die Konzentrationen an Endothelin-1 betragen erfindungsgemäß von 0,1 bis 100mMol/l, vorzugsweise 5,0 bis 50,0mMol/l und am meisten bevorzugt 5,0 bis 15,0mMol/l. Die angegebenen Konzentrationen sind jedoch insbesondere hinsichtlich der Obergrenzen nicht kritisch, jedoch aus Kostengründen zu bevorzugen.

[0020] Das erfindungsgemäße Melanozyten-Kulturmedium kann zusätzlich 0,1 bis 50 ng/ml EFG (Epidermal Growth Factor) und/oder 0,1 bis 50  $\mu$ g/ml Insulin enthalten. Bei beiden Proteinen handelt es sich um generelle Wachstumsfaktoren für Hautzellen, die vorzugsweise in der humanen Form verwendet werden. Da EGF auch das Wachstum von Fibroblasten fördert, ist seine Konzentration möglichst im unteren angegebenen Bereich anzusiedeln, obwohl auch höhere Konzentrationen verwendet werden können. Dies kann allerdings zum Verlust der Selektivität für Melanozyten führen. Bei dem hier genannten. Vorzugsweise enthält das Melanozyten-Kulturmedium 0,1 bis 50 ng/ml EFG und 0,1 bis 50  $\mu$ g/ml Insulin,



noch stärker bevorzugt 1 bis 10 ng/ml EFG und 1 bis 10 µg/ml Insulin.

[0021] In einem zweiten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung des oben beschriebenen Melanozyten-Kulturmediums zur Züchtung von Melanozyten, insbesondere zur selektiven Züchtung. Die Kulturbedingungen sind dem Fachmann bekannt und können anhand von Routineexperimenten optimiert werden.

[0022] Die Züchtung der Melanozyten unter Verwendung des erfindungsgemäßen Mediums erfolgt ausgehend von Gewebebiopsien eines Spenders und vorzugsweise des zu behandelnden Patienten selbst. Vorzugsweise sind die erhaltenen Melanozyten zur Reimplantation in den Menschen, insbesondere den Spender bestimmt. Sind Spender und Empfänger identisch, ist eine Transplantatabstoßung nicht zu befürchten, sofern nicht das Kulturmedium antigene Substanzen enthält. Letzteres entspricht nicht dem AMG und ist daher nicht erwünscht.

[0023] Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Mediums ist die selektive Inhibition des Fibroblastenwachstums bei gleichzeitig hohen Vermehrungsraten der Melanozyten. In entsprechenden Vergleichsversuchen mit den kommerziell von der Firma Promocell vertriebenen Melanozyten-Kulturmedien (TPA-Medium und TPA-freies Medium) hat die Anmelderin gefunden, dass das erfindungsgemäße Melanozyten-Kulturmedium den mit diesen genannten Medien erzielten Ergebnissen mindestens vergleichbare Ergebnisse liefert, wenn nicht bessere.

#### Ausführungsbeispiel

[0024] Für Vergleichsversuche mit den oben genannten Medien der Firma Promocell wurde folgendes Medium hergestellt und eingesetzt.

Tabelle 1: Verwendetes Medium

[0025] PC-1 Basalmedium (Bio Whittaker, Verviers, BE; Kat.-Nr. 77232) Supplement: (Bio Whittaker, Verviers, BE; Kat.-Nr. 344022)

+ 0,5mMol/l cAMP

+ 5 ng/ml bFGF

+ 10mMol/l α-MSH

+ 10mMol/l Endothelin-1

+ 5 ng/ml EGF

+ 5 µg/ml Insulin (entspricht 0,125 I.E./ml)

[0026] Zum direkten Vergleich wurden parallele Zellkulturen aus Biopsaten derselben Testpersonen mit den genannten Medien etabliert und nach gängigen Verfahren geführt. Im Ergebnis entspricht das Wachstum und die Morphologie von etablierten Melanozyten-Kulturen mit dem erfindungsgemäßen Medium etwa denjenigen des TPA-Mediums. Allerdings bietet das erfindungsgemäße Medium Vorteile bei der Etablierung der Kultur, dahingehend, dass die Zellausbeute durchschnittlich 5 bis 10-mal höher liegt. Diese höhere Zellausbeute könnte am Wachs-

tum von ebenfalls im Biopsat vorhandenen Keratinozyten liegen, die wiederum das Wachstum der Melanozyten fördern. Ein Wachstum von Keratinozyten wurde dagegen im TPA-Medium der Fa. Promocell nicht beobachtet.

[0027] Das TPA-freie Medium der Fa. Promocell, das ebenfalls als Vergleich genutzt wurde, weist vergleichbare Nachteile bezüglich der Primärkultur (Zellausbeuten) auf und liefert darüber hinaus wesentlich geringere Vermehrungsraten. So betrug in Vergleichsmessungen die Verdopplungsgeschwindigkeit mit dem TPA-freien Medium ca. 7 Tagen, während sie für das erfindungsgemäße Medium aus Tabelle 1 3 bis 5 Tage betrug.

[0028] Hinsichtlich Morphologie, Qualität der Zellen, Melaninsynthese oder maximaler Kulturdauer (d.h. Zahl der Passagen) entsprach oder übertraf das erfindungsgemäße Medium das jeweils bessere der beiden Vergleichsmedien in jedem Experiment.

#### Patentansprüche

1. Melanozyten-Kulturmedium, enthaltend ein für die Kultur von primären human Zellen geeignetes Basismedium, das einen Gehalt an  $\text{Ca}^{2+}$  von nicht unter 0,6mMol/l aufweist und mit Transferrin, Albumin und Glutamin supplementiert ist, welches Melanozyten-Kulturmedium zusätzlich enthält: 0,05 – 10,0mMol/l cAMP, 0,5 – 50 ng/ml bFGF, 0,1 – 100mMol/l α-MSH und 0,1 – 100mMol/l Endothelin-1.

2. Melanozyten-Kulturmedium nach Anspruch 1, enthaltend 0,1 – 1,0mMol/l cAMP, 1,0 – 15 ng/ml bFGF, 5,0 – 50mMol/l α-MSH und 5,0 – 50mMol/l Endothelin-1.

3. Melanozyten-Kulturmedium nach Anspruch 1, enthaltend 0,4 – 0,6mMol/l cAMP, 2,5 – 7,5 ng/ml bFGF, 5,0 – 15,0mMol/l α-MSH und 5,0 – 15,0mMol/l Endothelin-1.

4. Melanozyten-Kulturmedium nach einem der vorstehenden Ansprüche, zusätzlich enthaltend 0,1 – 50 ng/ml EFG und/oder 0,1 – 50 µg/ml Insulin.

5. Melanozyten-Kulturmedium nach einem der Ansprüche 1 bis 3, zusätzlich enthaltend 1 – 10 ng/ml EFG und 1 – 10 µg/ml Insulin.

6. Verwendung eines Melanozyten-Kulturmedium gemäß einem der vorstehenden Ansprüche zur Züchtung von Melanozyten.

7. Verwendung nach Anspruch 6, worin die Züchtung ausgehend von Gewebebiopsien eines Patienten erfolgt.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 6 bis 7, worin das Wachstum von konkurrierenden Fibroblasten selektiv inhibiert wird.

9. Melanozytensuspension in einem Medium gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen